

КОПИЯ

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора



Р.А. Максютов

19» декабря 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для амплификации
ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
в режиме реального времени
(«Вектор- МПЦР_{РВ}-Оспа»)
по ТУ 9398-035-05664012-2014

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора

Набор реагентов для амплификации ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «Вектор-МПЦРрв-Оспа» по ТУ 9398-035-05664012-2014, далее по тексту – «Набор реагентов «Вектор-МПЦРрв-Оспа».

1.2 Предназначение набора и его диагностическая роль

Набор реагентов «Вектор-МПЦРрв-Оспа» предназначен для выявления ДНК вирусов натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян (ВОО), оспы коров (ВОК), осповакцины (ВОВ) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на приборах CFX 96 («Био-Рад Лабораториес, Инк.», США) или аналогичных приборах других производителей.

Набор применяется с приборами CFX 96 («Био-Рад Лабораториес, Инк.», США).

Диагностическая роль набора реагентов «Вектор-МПЦРрв-Оспа» заключается в возможности его использования для ранней дифференцированной диагностики вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины, для эпидемиологического мониторинга.

1.3 Область применения набора

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины, эпидемиологический мониторинг.

Диагностические исследования могут осуществлять лаборатории, имеющие лицензии на проведение экспериментальных и/или диагностических видов работ с возбудителями инфекционных заболеваний 1 группы патогенности.

1.4 Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Только для профессионального использования.

Показания: в соответствии с назначением набора.

Противопоказаний и побочных эффектов при работе с набором реагентов «Вектор-МПЦРрв-Оспа» не выявлено.

Набор реагентов «Вектор-МПЦРрв-Оспа» предназначен только для однократного применения по назначению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «Вектор-МПЦРрв-Оспа» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор реагентов состоит из 7 реагентов.

№	Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
1.	Реагент-1-ПОКС	прозрачная светло-фиолетовая жидкость	0,15	1 пробирка

2.	Реагент-2-ПОКС	прозрачная бесцветная жидкость	0,25	1 пробирка
3.	ПКО-ВНО-ПОКС	прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
4.	ПКО-ВОО-ПОКС	прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
5.	ПКО-ВОК-ПОКС	прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
6.	ПКО-ВОВ-ПОКС	прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
7.	ОКО-ПОКС	прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

В состав набора входит эксплуатационная документация: инструкция по применению

Примечание: Паспорт (аналитический лист) на серию должен входить в комплект сопроводительной документации на продукцию. Число экземпляров (копий) паспорта каждой серии, входящих в комплект сопроводительной документации, должно быть определено в договоре на поставку продукции.

Реагент-1-ПОКС расфасован по 150 мкл в микропробирку вместимостью от 0,5 до 2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: HS-Taq ДНК-полимераза в буферном растворе.

Реагент-2-ПОКС расфасован по 250 мкл в микропробирку вместимостью 0,5 до 2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: олигонуклеотидные праймеры, флуоресцентные зонды.

Положительные контрольные образцы ПКО-ВНО-ПОКС, ПКО-ВОО-ПОКС, ПКО-ВОК-ПОКС, ПКО-ВОВ-ПОКС расфасованы по 100 мкл в микропробирки объемом 0,5-2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: раствор рекомбинантных бактериальных плазмид в ТЕ-буфере, содержащих вставки ДНК, комплементарные участкам генома вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины соответственно.

Отрицательный контрольный образец ОКО-ПОКС расфасован по 100 мкл в микропробирку объемом 0,5-2,0 мл, с завинчивающейся крышкой. Состав: деионизованная вода.

Набор реагентов упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой. Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку. В этом случае пакет и инструкцию по применению вкладывают в коробку.

П р и м е ч а н и е - Ингредиентами, которые могут влиять на измерения, являются праймеры и флуоресцентные зонды, основной характеристикой которых для конечного пользователя является температура отжига, составляющая 63 °С. Данная характеристика реализуется с помощью температурно-временного режима амплификации, следовательно, его соблюдение является строго обязательным.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на проведение 20 определений, включая контроли.

2.3 Метод исследования

Обнаружение фрагментов нуклеиновых кислот вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины основано на использовании МПЦР, представляющей собой повторяющиеся циклы амплификации специфических областей ДНК-мишеней в присутствии ДНК-полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферного раствора и олигонуклеотидных праймеров, распознающих ДНК-мишень. Для амплификации фрагментов вирусной ДНК подобраны четыре пары специфических олигонуклеотидных праймеров. Для детекции продуктов амплификации применяются вирусспецифические флуоресцентно-меченые ДНК-зонды, и накопление флуоресцентного сигнала по определенному каналу детекции соответствует наличию в реакционной смеси специфических продуктов амплификации.

2.4 Ограничения метода

В инфицированном материале ДНК вирусов может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР и/или недостаточной эффективности выделения нуклеиновых кислот. Для достижения показателя аналитической чувствительности (предел обнаружения (LoD)) используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения НК на уровне не менее 20 %.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения НК либо проведения реакции ПЦР. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР (п. 8.3 настоящей инструкции).

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ПЦР и/или недостаточная эффективность выделения НК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью положительных контрольных образцов ПЦР (п. 8.3 настоящей инструкции).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитические характеристики

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирской области) в рамках исследования эффективности набора.

3.1.1 Аналитическая чувствительность

Набор реагентов должен выявлять 1×10^3 копий ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины в 25 мкл реакционной смеси.

3.1.2 Специфичность

Набор реагентов не должен давать положительных результатов с образцами здоровых доноров или образцами, содержащими генетический материал гетерологичных вирусов.

3.2 Диагностические характеристики

Исследования аналитических характеристик набора проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово, Новосибирской области).

3.2.1 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность - не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 % при исследовании 100 (2 по 50) положительных образцов, содержащих ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины в концентрации не менее

1×10³ копий ДНК в 25 мкл реакционной смеси.

3.2.2 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность - не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 % при исследовании 100 (2 по 50) положительных образцов, содержащих ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины и 100 (2 по 50) отрицательных образцов, содержащих генетический материал гетерологичных вирусов.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Вирусы натуральной оспы и оспы обезьян отнесены к I группе патогенности. Работа с материалом подозрительным на зараженность вирусами натуральной оспы и оспы обезьян должна проводиться в соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности», МР 3.1.0290-2022 «Противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение возникновения и распространения оспы обезьян».

Все работы по отбору проб от больных, транспортировке и все этапы лабораторного исследования проводятся в строгом соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», МУ 3.4.2552-09 «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения».

Материал для исследований подлежит предварительной обработке в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные;
- инактивировать исходные исследуемые образцы биологического материала в соответствии методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;
- неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, отходы после амплификации следует удалять в соответствии с требованиями СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Потенциальный риск применения набора – класс 3 (п. 9 приложения № 2 к приказу Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

4.1 Необходимость обучения персонала

Для выполнения анализа с помощью данного набора реагентов необходимо участие специалистов не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончивших соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности, не имеющих противопоказаний к применению средств профилактики и лечения и к работе в средствах индивидуальной защиты.

Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

4.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

При работе с набором соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

4.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

4.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1 Рекомендуемое измерительное оборудование

Амплификацию проводят на приборе «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 исполнения: C1000» производства "Био-Рад Лабораториз, Инк.", США, РУ № ФСЗ 2008/03399 (далее по тексту - CFX 96).

5.2 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором следует проводить в настольном боксе с бактерицидной лампой (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 3 (МУ 1.3.2569-09).

5.3 Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 0,5-10 мкл, 2-20 мкл и на 20-200 мкл.

5.4 Другое используемое оборудование

- ПЦР-бокс (БАВ-ПЦР «Ламинар-С» («Ламинарные системы», Россия) или аналогичный другого производителя).
- Центрифуга для микропробирок до 12000 об/мин.
- Встряхиватель пробирок «Вортекс».
- Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 и 1,5 мл.
- Морозильная камера от минус 15 до минус 25°C.

5.5 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

Наконечники с аэрозольным барьером.

5.6 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

- Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В», (РУ № ФСР 2009/05220) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 20 мкл.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл.
- Отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки.
- Комплект средств для обработки рабочего места.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Получение и обработка биологического материала, зараженного или подозрительного на зараженность вирусами натуральной оспы и оспы обезьян, не являются частью процедуры анализа с использованием набора реагентов «Вектор-МПЦР_{РВ}-Оспа» и осуществляется в соответствии СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

6.1 Тип исследуемых образцов

Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб: содержимого кожных поражений (в зависимости от стадии болезни – везикул, пустул, корочки, соскоб со дна пузырьков, макул или папул), мазков с задней стенки глотки и миндалин, крови, аутопсийного материала.

6.2 Процедура получения биологического материала

Получение биологического материала для диагностического подтверждения инфекции вирусами натуральной оспы и/или оспы обезьян и его транспортирование проводится в соответствии с МУ 3.4.2552-09 «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения», СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и МР 3.1.0290-2022 «Противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение возникновения и распространения оспы обезьян».

В качестве проб для диагностического исследования используют:

- Содержимое кожных поражений (в зависимости от стадии болезни – везикул, пустул, корочки, соскоб со дна пузырьков, макул или папул);
- Мазки с задней стенки глотки и миндалин;
- Цельная венозная кровь (ЭДТА);
- В случае смерти - кусочки органов умерших (аутопаты легких, печени и селезенки человека).

Отбор проб, упаковку и транспортирование осуществляют в соответствии с СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Содержимое везикул или пустул отсасывают туберкулиновым шприцем, прокалывая стенку пузырька у его основания: для этой цели может использоваться игла, конец которой помещают над открытой пробиркой и несколько наклоняют его вниз, что облегчает отток жидкости. При недостаточной наполненности пузырьков в периоде подсыхания пустул для получения пробы применяют два способа. После вскрытия пузырька скальпелем или другим острым инструментом сбор остатков жидкости производят небольшими ватными тампонами (на коротком стержне), которые помещают затем в сухую пробирку, отламывая при необходимости стержни. При затруднении в использовании вышеописанного способа скальпелем или маленькими ножницами срезают верхушки пузырьков и помещают их в отдельную пробирку. Корочки отделяют глазным пинцетом. Собранный из 6-10 однородных кожных элементов больного материал помещают в пластиковые пробирки или флаконы с герметически закрывающимися крышками. Крышки дополнительно фиксируют – например, парафинизированным полиэтиленом (парафильмом), липкой лентой, расплавленным парафином.

При отсутствии у больного кожных поражений, что может иметь место в ранней стадии, болезни берут мазки с задней стенки глотки и миндалин. Процедуру осуществляют с помощью ватных тампонов на стержне, который затем опускают в пластиковую пробирку или флакон, не добавляя жидкости, и герметически ее закрывают. Мазки из зева следует брать и при недостаточном количестве материала из кожных поражений.

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа «Vacurette®» (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА). После взятия крови

пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом.

В случае смерти больного с подозрением на натуральную оспу или оспу обезьян при аутопсии берут фрагменты кожи с поражениями, кусочки внутренних органов (лёгких, печени, почек, селезёнки) (предпочтительнее с макроскопически видимыми поражениями).

Сразу после взятия пробы пробирки маркируют, указывая фамилию и инициалы больного, возраст, день болезни, вид материала (например, кровь, корочки и т.д.) и дату его взятия. Остальные сведения о больном (предполагаемый диагноз, дату поступления, вакцинальный статус и пр. указывают в сопроводительной карточке).

После завершения сбора образцов от больного (больных) все инструменты и подсобные материалы, а также использованные средства индивидуальной защиты (перчатки, халат и пр.) дезинфицируют согласно требованиям СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

6.3 Ограничения по использованию анализируемого материала

Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала

При сборе клинического материала необходимо учитывать влияние интерферирующих веществ (эндогенных и экзогенных), которые могут встречаться в клинических образцах и ингибировать выделение ДНК (Kovarova M., Draber P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. Nucleic Acids Res 2000 Jul 1; 28(13)).

- Эндогенные факторы: гемоглобин (концентрация в крови ~ 160 мг/мл), при проведении ПЦР уменьшает выход при концентрации в реакционной смеси >1 мг/мл, мочевины (в моче ~350 мМ), в среднем, начинает ингибировать при >20 мМ.

- Экзогенные факторы: гепарин (ингибирует ПЦР при концентрации более 0,15 Ед./мл, не устраняется органическими растворителями и переосаждением).

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;

- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

Сведения о других интерферирующих веществах, при условии соблюдения правил взятия исследуемого материала, указанных в инструкции, отсутствуют.

6.4 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых образцов

Транспортирование отобранного клинического материала в лабораторию для исследований проводят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 3 суток в соответствии с СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Допускается хранение образцов цельной крови:

- при комнатной температуре – в течение 2 часов;
 - при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток.
- Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

Образцы отобранного клинического материала хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 суток, при температуре от минус 16 °С до минус 20 °С не более одного месяца, при температуре минус 70 °С или в жидком азоте в течение 1 года, не допуская его оттаивания до проведения исследования.

При замораживании клинического материала его транспортировка также должна проводиться в замороженном состоянии. Допускается только однократное замораживание-оттаивание образцов.

6.5 Меры предосторожности к материалу исследования

Учет, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие вируса оспы обезьян, должны осуществляться в соответствии с действующими СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Клинический материал, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал утилизируют по классу В, как чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" (СанПиН 2.1.3684-21) и СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

В соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» для проведения процедуры обеззараживания материал помещают в пробирку объемом 1,5 мл, добавляют 500 мкл лизирующего буфера, на основе 6 М гуанидинизотиоцианата и фенола (1:1) и инкубируют 20 мин при температуре 65 °С.

После проведения процедуры обеззараживания производится выделение ДНК в соответствии с Инструкцией по применению набора реагентов для выделения. В качестве пробы используют 100 мкл материала после проведения процедуры обеззараживания. Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °С, и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

Внимание! При работе ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

7.1 Процедура приготовления реакционной смеси

Приготовление реакционной смеси: в отдельной микропробирке объемом 1,5 мл готовят смесь компонентов следующего состава (из расчета на одну пробу):

Реагент-1-ПОКС	7,5 мкл
----------------	---------

Реагент-2-ПОКС 12,5 мкл

Смесь перемешивают пипетированием. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с помощью дозаторов переменного объема: 0.5-10, 2-20 и 20-200 мкл.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Расход каждого реагента (минимальный)

На одно определение расходуются:

Реагент-1-ПОКС	7,5 мкл
Реагент-2-ПОКС	12,5 мкл

На каждый анализ расходуются:

- 5 мкл ПКО-ВНО-ПОКС;
- 5 мкл ПКО-ВОО-ПОКС;
- 5 мкл ПКО-ВОК-ПОКС;
- 5 мкл ПКО-ВОВ-ПОКС;
- 5 мкл ОКО;

8.2 Последовательность проведения этапов анализа

8.2.1 ПЦР-амплификация

Включают прибор, запускают программу в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Реактивы для проведения ПЦР извлекают из холодильника, размораживают. Перед использованием встряхивают пробирки с реагентами на микроцентрифуге-вортекс и осаждают капли на дно пробирки кратковременным центрифугированием в течение 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹.

Для проведения амплификации используют прозрачные микропробирки объемом 0,2 мл в соответствии с количеством исследуемых образцов.

Помещают микропробирки в штатив и маркируют в соответствии с протоколом исследования на боковой стенке пробирки.

Готовят реакционную смесь на нужное количество реакций, для чего смешивают в отдельной пробирке (из расчета на одну пробу):

Реагент-1-ПОКС	7,5 мкл
Реагент-2-ПОКС	12,5 мкл

Открывают крышки микропробирок и вносят в них по 20 мкл реакционной смеси.

Используя наконечники с аэрозольным барьером, в микропробирки последовательно вносят соответственно маркировке образцов 5 мкл ОКО-ПОКС, и затем по 5 мкл растворов ДНК исследуемых образцов, закрывают крышки данных микропробирок. Вносят (в последнюю очередь) по 5 мкл ПКО-ВНО-ПОКС, ПКО-ВОО-ПОКС, ПКО-ВОК-ПОКС, ПКО-ВОВ-ПОКС и закрывают крышки данных микропробирок.

Общий (конечный) объем реакционной смеси в каждой пробирке должен составить 25 мкл.

Перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют 5 секунд при 3000 об·мин⁻¹.

Внимание! После смешивания компонентов микропробирки сразу устанавливают в амплификатор и запускают реакцию.

Внимание! Следует избегать нанесение маркировки на крышки микропробирок, помещенных в амплификатор.

Задают следующую программу амплификации:

Температура (0С)	Время (минуты:секунды)	Измерение флуоресценции	Количество циклов
95	05:00		1
94	00:15		5
63	01:00		
94	00:15		40
63	01:00	FAM, HEX, ROX, Cy5	

8.3 Процедура измерения и оценки результатов анализа

ПЦР в режиме реального времени и регистрацию результатов проводят в приборе CFX 96 (BioRad, США) по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5.

Анализ результатов амплификации

ДНК вируса натуральной оспы проводят по каналу FAM,

ДНК вируса оспы коров проводят по каналу HEX,

ДНК вируса оспы обезьян проводят по каналу ROX,

ДНК вируса осповакцины проводят по каналу Cy5, для этого:

Устанавливают Threshold/Порог на середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла "Ct" в соответствующей графе в таблице результатов).

Отрицательные результаты не исключают возможность инфицирования вирусами натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациентов.

Результат подлежит учету в случае:

а) появления пересечения кривых флуоресценции с пороговой линией на каждом из каналов FAM, HEX, ROX, CY5 в пробах с положительными контрольными образцами ПК-ВНО-ПОКС, ПК-ВОК-ПОКС, ПК-ВОО-ПОКС, ПК-ВОВ-ПОКС, соответственно;

б) отсутствия положительного сигнала на каждом из каналов FAM, HEX, ROX, CY5 в пробе с отрицательными контрольными образцами (ОКО-ПОКС).

Результат считать положительным в случае, если кривая накопления флуоресценции для соответствующего образца имеет характерную «сигмовидную» форму

и пересекает пороговую линию. При этом значение C_t для данного образца должно быть менее 35. Амплитуда сигнала при этом не имеет значения.

Результат считать отрицательным, если значение C_t на каналах FAM, HEX, ROX, CY5 отсутствует. Если значение C_t больше 35, то ПЦР-РВ необходимо повторить и считать положительным в случае повторения результата или при значении C_t меньше 35.

9 РАСЧЕТЫ

9.1 Используемые компьютерные программы

Для проведения амплификации, гибридизации и учета результатов используют специализированное программное обеспечение, поставляемое производителями приборов. Работу с программным обеспечением осуществляют согласно руководству по эксплуатации прибора.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1 Условия хранения набора

Набор реагентов «Вектор-МПЦР_{РВ}-Оспа» хранить в упаковке предприятия-изготовителя в соответствии с ТУ 9398-035-05664012-2014 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С. Хранение набора реагентов должно осуществляться в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.2 Условия транспортирования набора

Транспортирование набора реагентов «Вектор-МПЦР_{РВ}-Оспа» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с ТУ 9398-035-05664012-2014 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С в термоконтейнере. Допускается транспортирование при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере в течение не более 3 суток. Набор реагентов, транспортируемый с нарушением температурного режима применению не подлежит.

10.3 Срок годности набора

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев со дня изготовления предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

10.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят с целью последующей инактивации согласно требованиям СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

Наборы с истекшим сроком годности, вскрытые, но не использованные наборы, а также наборы с поврежденной упаковкой, утилизируют по классу А, как

эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.3684-21).

10.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «Вектор-МПЦР₇₃-Оспа» в течение срока годности направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, Россия, Новосибирская область, рабочий поселок Кольцово, тел. (383) 336-60-10, факс(383) 336-74-09 e-mail: vector@vector.nsc.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.

Зав. отделом разработки
и производства средств
диагностики вирусных заболеваний
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора»

 Е.В. Чуб

Зав. ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора»

 М.П. Богрянцева



В данном документе
приведено,
подтверждено и скреплено
исходить 14 листов
Четырнадцатого листа
Зав. 0574 *М.П. Бокренев*
подпись

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Экспериментальный участок
по разработке и производству МИ
для диагностики ин витро

630559, рабочий поселок Кольцово,
Новосибирской области
Телефон ОБТК: 8(383)-363-47-00 доб. 28-37

П А С П О Р Т № 29 от 04.07.2022

Набор реагентов для амплификации ДНК вирусов
натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
«Вектор-МПЦР_{FB}-Оспа»
по ТУ 9398-035-05664012-2014

Номер серии № 01-07-2022
Количество в серии 10
Дата выпуска 04.07.2022

Контрольный номер ОБТК № 29
Дата изготовления 04.07.2022

Анализ выполнен по ТУ 9398-035-05664012-2014, изм. 1
Регистрационное удостоверение № РЗН 2016/3685 от 02.06.2017 г.

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
Описание	Реагент-1-ПОКС - прозрачная светло-фиолетовая жидкость. Реагент-2-ПОКС, ПКО-ВНО-ПОКС, ПКО-ВОО-ПОКС, ПКО-ВОК-ПОКС, ПКО-ВОВ-ПОКС и ОКО-ПОКС – прозрачные бесцветные жидкости.	Реагент-1-ПОКС - прозрачная светло-фиолетовая жидкость. Реагент-2-ПОКС, ПКО-ВНО-ПОКС, ПКО-ВОО-ПОКС, ПКО-ВОК-ПОКС, ПКО-ВОВ-ПОКС и ОКО-ПОКС – прозрачные бесцветные жидкости.
Специфичность	Наличие положительного сигнала на канале FAM в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВНО-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале HEX в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОК-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале ROX в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОО-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале CY5 в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОВ-ПОКС и отсутствие положительного сигнала на каналах FAM, HEX, ROX, CY5 в пробе с отрицательными контрольными образцами (ОКО-ПОКС и СОП-ДНК человека).	Соответствует (протокол № 1 ПОКС от 04 июля 2022 г.) Наличие положительного сигнала на канале FAM в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВНО-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале HEX в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОК-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале ROX в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОО-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале CY5 в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОВ-ПОКС и отсутствие положительного сигнала на каналах FAM, HEX, ROX, CY5 в пробе с отрицательными контрольными образцами (ОКО-ПОКС и СОП-ДНК человека (серия № 01-07.20).

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
Чувствительность	Набор реагентов должен выявлять в ПЦР 1×10^3 копий каждой из рекомбинантных плазмид, несущих видоспецифические вставки для вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины, в 25 мкл реакционной смеси.	Выявляет в ПЦР 5×10^1 копий СОП ПКОВНО; 5×10^1 копий СОП ПКОВК; 5×10^2 копий СОП ПКОВОО; 5×10^1 копий СОП ПКОВОВ в 25 мкл реакционной смеси. Использовали последовательные разведения и СОП ПКОВНО серия № 01-06.22, СОП ПКОВОО серия № 01-06.22, СОП ПКОВК серия № 01-06.22, СОП ПКОВОВ серия № 01-06.22 с шагом 10 от 5×10^3 до 5×10^1 копий плазмидной ДНК в 25 мкл реакционной смеси.
Комплектность	В комплект поставки входит: - набор реагентов; - инструкция по применению.	Соответствует
Упаковка	В микропробирках с завинчивающейся крышкой вместимостью 0,5 мл, 1,5 мл и 2,0 мл (полипропиленовые, "Ахуген", США или аналогичные). Набор реагентов упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой ("Медиген", Россия, кат. № 170107 или аналогичный). Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку.	Соответствует
Маркировка	В соответствии с ТУ п. 1.5	Соответствует

Транспортирование набора реагентов должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с требованиями ТУ 9398-035-05664012-2014, изм.1 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С в термоконтейнере. Допускается транспортирование при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере в течение не более 3 суток.

Хранение при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С

Срок годности – 1 год.

Заключение: соответствует требованиям ТУ 9398-035-05664012-2014, изм. 1.

Зав. отделом - начальник
экспериментального участка по
разработке и производству медицинских
изделий для диагностики ин витро
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора

Зав. ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора

 Е. В. Чуб



 М.П. Богрянцева

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Экспериментальный участок
по разработке и производству МИ
для диагностики ин витро

630559, рабочий поселок Кольцово,
Новосибирской области
Телефон ОБТК: 8(383)-363-47-00 доб. 28-37

П А С П О Р Т № 30 от 06.07.2022

Набор реагентов для амплификации ДНК вирусов
натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
«Вектор-МПЦР_{РВ}-Оспа»
по ТУ 9398-035-05664012-2014

Номер серии № 02-07-2022
Количество в серии 10
Дата выпуска 06.07.2022

Контрольный номер ОБТК № 30
Дата изготовления 06.07.2022

Анализ выполнен по ТУ 9398-035-05664012-2014, изм. 1
Регистрационное удостоверение № РЗН 2016/3685 от 02.06.2017 г.

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
Описание	Реагент-1-ПОКС - прозрачная светло-фиолетовая жидкость. Реагент-2-ПОКС, ПКО-ВНО-ПОКС, ПКО-ВОО-ПОКС, ПКО-ВОК-ПОКС, ПКО-ВОВ-ПОКС и ОКО-ПОКС – прозрачные бесцветные жидкости.	Реагент-1-ПОКС - прозрачная светло-фиолетовая жидкость. Реагент-2-ПОКС, ПКО-ВНО-ПОКС, ПКО-ВОО-ПОКС, ПКО-ВОК-ПОКС, ПКО-ВОВ-ПОКС и ОКО-ПОКС – прозрачные бесцветные жидкости.
Специфичность	Наличие положительного сигнала на канале FAM в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВНО-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале HEX в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОК-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале ROX в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОО-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале CY5 в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОВ-ПОКС и отсутствие положительного сигнала на каналах FAM, HEX, ROX, CY5 в пробе с отрицательными контрольными образцами (ОКО-ПОКС и СОП-ДНК человека).	Соответствует (протокол № 2 ПОКС от 06 июля 2022 г.) Наличие положительного сигнала на канале FAM в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВНО-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале HEX в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОК-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале ROX в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОО-ПОКС, наличие положительного сигнала на канале CY5 в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ВОВ-ПОКС и отсутствие положительного сигнала на каналах FAM, HEX, ROX, CY5 в пробе с отрицательными контрольными образцами (ОКО-ПОКС и СОП-ДНК человека (серия № 01-07.20)).

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
Чувствительность	Набор реагентов должен выявлять в ПЦР 1×10^3 копий каждой из рекомбинантных плазмид, несущих видоспецифические вставки для вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины, в 25 мкл реакционной смеси.	Выявляет в ПЦР 5×10^1 копий СОП ПКО ВНО; 5×10^1 копий СОП ПКО ВОК; 5×10^2 копий СОП ПКО ВОО; 5×10^1 копий СОП ПКО ВОВ в 25 мкл реакционной смеси. Использовали последовательные разведения и СОП ПКО ВНО серия № 01-06.22, СОП ПКО ВОО серия № 01-06.22, СОП ПКО ВОК серия № 01-06.22, СОП ПКО ВОВ серия № 01-06.22 с шагом 10 от 5×10^3 до 5×10^1 копий плазмидной ДНК в 25 мкл реакционной смеси.
Комплектность	В комплект поставки входит: - набор реагентов; - инструкция по применению.	Соответствует
Упаковка	В микропробирках с завинчивающейся крышкой вместимостью 0,5 мл, 1,5 мл и 2,0 мл (полипропиленовые, "Ахуген", США или аналогичные). Набор реагентов упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой ("Медиген", Россия, кат. № 170107 или аналогичный). Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку.	Соответствует
Маркировка	В соответствии с ТУ п. 1.5	Соответствует

Транспортирование набора реагентов должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) в соответствии с требованиями ТУ 9398-035-05664012-2014, изм.1 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С в термоконтейнере. Допускается транспортирование при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере в течение не более 3 суток.

Хранение при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С

Срок годности – 1 год.

Заключение: соответствует требованиям ТУ 9398-035-05664012-2014, изм. 1.

Зав. отделом - начальник
экспериментального участка по
разработке и производству медицинских
изделий для диагностики ин витро
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора

Зав. ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



Е. В. Чуб



М.П. Богрянцева



В дан ом документе
I-подписано
процедуры и саринские
печатью 4 листов
Чегофе миста
Зав. 0594 И.И. Бородин
должность, подпись

630559, рабочий поселок Кольцово,
Новосибирской области
Телефон ОБТК: 8(383)-363-47-00, доб. 28-37

Стандартный образец предприятия – Положительный контрольный образец для контроля чувствительности набора реагентов «Вектор-МПЦР_{РВ}-Оспа»
(СОП ПК О ВОО)

Контрольный номер ОБТК № 21
Дата изготовления 22.06.2022

Транспортирование должно производиться в соответствии с требованиями
№ ЛР 05664012-024-14 не более 3-х суток при температуре от 2 °С до 8 °С в термоконтейнере.
Хранение при температуре минус 20 °С.
Срок годности – 5 лет.

[illegible]

 ООО ЦИПМИ **INFO@CIRMI.RU** **WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU**

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Экспериментальный участок
по разработке и производству МИ
для диагностики ин витро

630559, рабочий поселок Кольцово,
Новосибирской области
Телефон ОБТК: 8(383)-363-47-00, доб. 28-37

П А С П О Р Т № 22 от 27.06.2022

Стандартный образец предприятия – Положительный контрольный образец для контроля чувствительности набора реагентов «Вектор-МПЦР_{РВ}-Оспа» (СОП ПКОВОК)

Номер серии № 01-06.22
Количество в серии 5
Дата выпуска 27.06.2022

Контрольный номер ОБТК № 22
Дата изготовления 22.06.2022

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
Внешний вид	СОП ПКОВОК – прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
Подлинность, специфичность	GGTAGGTTTCATGTTGGAAAATATCTCCAT AACTAATTCTTTTGGGATGGTATTCAAGT AAGTTGGTTGATCATGGTCTATGTAGTAG ATGACTTTCCTCATAAGATTGCATTTCTC TCTAATACCACTAGTAACATCTT	Соответствует (протокол № 1С от 27 июня 2022 г.)
Объем	0,5 мл	Соответствует
Концентрация	Концентрация плазмидной ДНК – не менее 10 нг/мл	29 нг/мл ($6,98 \cdot 10^9$ копий/мл) Соответствует (протокол № 1К от 27 июня 2022 г.)
Упаковка	В микропробирках объемом 1,5 мл (полипропиленовые, "Eppendorf", США Кат. № 0030125215 или аналогичные). СОП ПКОВОК упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой ("Медиген", Россия, кат. № 170107 или аналогичный). Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку.	Соответствует
Маркировка	В соответствии с требованиями лабораторного регламента № ЛР 05664012-024-14	Соответствует

Транспортирование должно производиться в соответствии с требованиями № ЛР 05664012-024-14 не более 3-х суток при температуре от 2°C до 8°C в термоконтейнере.
Хранение при температуре минус 20 С.
Срок годности – 5 лет.

Заключение: соответствует требованиям лабораторного регламента № ЛР 05664012-024-14.

Зав. ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

М.П. Богрянцева



ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Экспериментальный участок
по разработке и производству МИ
для диагностики ин витро

630559, рабочий поселок Кольцово,
Новосибирской области
Телефон ОБТК: 8(383)-363-47-00 доб. 28-37

П А С П О Р Т № 23 от 27.06.2022

Стандартный образец предприятия – Положительный контрольный образец для контроля чувствительности набора реагентов «Вектор-МПИЦР_{РВ}-Оспа» (СОП ПКОВОВ)

Номер серии № 01-06.22
Количество в серии 5
Дата выпуска 27.06.2022

Контрольный номер ОБТК № 23
Дата изготовления 22.06.2022

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
Внешний вид	СОП ПКОВОВ – прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
Подлинность, специфичность	GGCAATGGATTTCAGGGATATACGAAACA CCGATAAATTATAAAAAAGCAATGTGT CCGCTGTTTCCGTTAATAATACTATTTTC GTAACCTGGCGGATTATTTCATAAAT	Соответствует (протокол № 1С от 27 июня 2022 г.)
Объем	0,5 мл	Соответствует
Концентрация	Концентрация плазмидной ДНК – не менее 10 нг/мл	30 нг/мл ($7,23 \cdot 10^9$ копий/мл) Соответствует (протокол № 1К от 27 июня 2022 г.)
Упаковка	В микропробирках объемом 1,5 мл (полипропиленовые, "Eppendorf", США Кат. № 0030125215 или аналогичные). СОП ПКОВОВ упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой ("Медиген", Россия, кат. № 170107 или аналогичный). Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку.	Соответствует
Маркировка	В соответствии с требованиями лабораторного регламента № ЛР 05664012-024-14	Соответствует

Транспортирование должно производиться в соответствии с требованиями № ЛР 05664012-024-14 не более 3-х суток при температуре от 2°C до 8°C в термоконтейнере.
Хранение при температуре минус 20 °C.
Срок годности – 5 лет.

Заключение: соответствует требованиям лабораторного регламента № ЛР 05664012-024-14.

Зав. ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

М.П. Богрянцева



ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
Экспериментальный участок
по разработке и производству МИ
для диагностики ин витро

630559, рабочий поселок Кольцово,
Новосибирской области
Телефон ОБТК: 8(383)-363-47-00 доб. 28-37

П А С П О Р Т № 24 от 27.06.2022

Стандартный образец предприятия – Положительный контрольный образец для контроля чувствительности набора реагентов «Вектор-МПЦР_{РВ}-Оспа» (СОП ПКОВНО)

Номер серии № 01-06.22
Количество в серии 5
Дата выпуска 27.06.2022

Контрольный номер ОБТК № 24
Дата изготовления 22.06.2022

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
Внешний вид	СОП ПКОВНО – прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость
Подлинность, специфичность	TCTGTA C T A T G T G T T A A A A G A T T C T A C A A G T A A C A A C A A A A A T A A A A T A A T A A T A A G T C C T T A A C G A A C G T T G A T G G A C A C C A C G T T T G T T A T T A C T C C A A T G G G T A T G C T G A C T A T A A C A G A T A C A T T	Соответствует (протокол № 1С от 27 июня 2022 г.)
Объем	0,5 мл	Соответствует
Концентрация	Концентрация плазмидной ДНК – не менее 10 нг/мл	34 нг/мл ($8,19 \cdot 10^9$ копий/мл) Соответствует (протокол № 1К от 27 июня 2022 г.)
Упаковка	В микропробирках объемом 1,5 мл (полипропиленовые, "Eppendorf", США Кат. № 0030125215 или аналогичные). СОП ПКОВНО упаковывают в полиэтиленовый пакет с застежкой ("Медиген", Россия, кат. № 170107 или аналогичный). Вторичной упаковкой может быть пакет с застежкой или пакет, вложенный в коробку.	Соответствует
Маркировка	В соответствии с требованиями лабораторного регламента № ЛР 05664012-024-14	Соответствует

Транспортирование должно производиться в соответствии с требованиями
№ ЛР 05664012-024-14 не более 3-х суток при температуре от 2°C до 8°C в термokonтейнере.
Хранение при температуре минус 20 С.
Срок годности – 5 лет.

Заключение: соответствует требованиям лабораторного регламента № ЛР 05664012-024-14

Зав. ОБТК
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

М.П. Богрянцева





В данном документе
прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 4 листов
Четыре листа
происходит
Зав. ЦДРК М.П. Бочарникова
должность, подпись

Информация о продукте

БиоМастер HS-qPCR (2x)

Набор БиоМастер HS-qPCR (2x) содержит 2x реакционную смесь **БиоМастер HS-qPCR (2x)** и стерильную воду. 2x реакционная смесь **БиоМастер HS-qPCR (2x)** предназначена для проведения количественного ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов. В состав **БиоМастер HS-qPCR (2x)** входят все необходимые компоненты ПЦР (исключая ДНК-матрицу, праймеры и зонд):

- высокопроцессивная рекомбинантная *HS-Taq* ДНК-полимераза;
- смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов;
- ПЦР-буфер;
- Mg^{2+} .

Смесь оптимизирована для проведения эффективной и воспроизводимой ПЦР с "горячим" стартом в режиме реального времени с образцами геномной, плазмидной и вирусной ДНК. В состав смеси входят добавки, повышающие время полужизни и процессивность *HS-Taq* ДНК-полимеразы за счет повышения её стабильности во время ПЦР. **БиоМастер HS-qPCR (2x)** реакционная смесь не содержит вещества, влияющие на температуры отжига праймеров и характеристики плавления матрицы.

ДНК-полимераза, входящая в её состав, неактивна при комнатной температуре. Для её активации необходим прогрев реакционной смеси при 95 °С в течение 5 мин. Представленная форма набора для проведения ПЦР экономит время и снижает вероятность контаминации за счет малого числа шагов пипетирования.

Состав набора

Кат. #	БиоМастер HS-qPCR (2x)	Вода	Кол-во реакций по 25 мкл
MH020-400	4 × 1.25 мл	4 × 1.25 мл	400
MH020-2040	17 × 1.5 мл	3 × 1.8 мл	2040

Состав БиоМастер HS-qPCR (2x)

100 mM Трис-НCl, pH 8.5, 100 mM KCl, 0.4 mM каждого нуклеотидтрифосфата, 10 mM $MgCl_2$, 0.1 ед. акт./мкл *HS-Taq* ДНК-полимеразы, 0.025% Tween 20, стабилизаторы *Taq* ДНК-полимеразы.

Область применения

- ПЦР с "горячим" стартом в режиме реального времени с применением флуоресцентно-меченых зондов;
- Обычная ПЦР;
- Высоковоспроизводимая ПЦР;
- Мультиплексная ПЦР;
- Генотипирование.

Свойства полимеразы

Рекомбинантная *HS-Taq* ДНК-полимераза обладает 5'-3' ДНК-зависимой полимеразной активностью и 5'-3' экзонуклеазной активностью нативной *Taq* ДНК-полимеразы из

Thermus aquaticus. Скорость продвижения *Taq* ДНК-полимеразы зависит от сложности ДНК-матрицы и составляет примерно 1 т.п.о./мин. Рекомбинантная *HS-Taq* ДНК-полимераза идеально подходит для стандартной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени.

Свойства реакционной смеси

- Реакционная смесь неактивна при комнатной температуре благодаря технологии "горячий" старт и активируется после инкубации при 95 °С в течение 5 мин;
- Смесь оптимизирована для специфичной работы *HS-Taq* ДНК-полимеразы, длительного хранения (хранение **БиоМастер HS-qPCR (2x)** в течение месяца при комнатной температуре не снижает эффективность ПЦР), многократного замораживания-размораживания.

Преимущества использования

- Фермент с "горячим" стартом повышает специфичность, чувствительность и выход реакции;
- Для активации *HS-Taq* ДНК-полимеразы требуется не более 5 мин.
- Высокие селективность и выход реакции.
- Сокращается время на подготовку реакции;
- Снижается вероятность контаминации при смешивании компонентов ПЦР;
- Стандартизируются условия постановки однотипных реакций (снижается погрешность при смешивании компонентов ПЦР в разных экспериментах);
- Минимизируются трудозатраты.

Ограничения к использованию

- Не рекомендуется использовать для ПЦР в реальном времени с интеркалирующими красителями. Для таких приложений следует использовать наборы **БиоМастер qPCR ROX SYBR Blue (2x)** или **БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2x)**.

Протокол выполнения амплификации

1. Разморозить реакционную смесь и тщательно перемешать.
2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 25 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
БиоМастер HS-qPCR (2x)	12,5	1x
Прямой праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
Обратный праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
Зонд	переменный	0,1 – 300 нМ
ДНК-матрица	переменный	1 пг – 1 мкг
Стерильная вода	до 25 мкл	

3. Осторожно перемешать и сбросить капли, используя центрифугу.

4. Провести ПЦР, используя рекомендованные ниже температурные условия:

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	30 - 50
Отжиг	50 - 68	5-15 сек	
Элонгация	58 - 72	5-30 сек	

Либо:

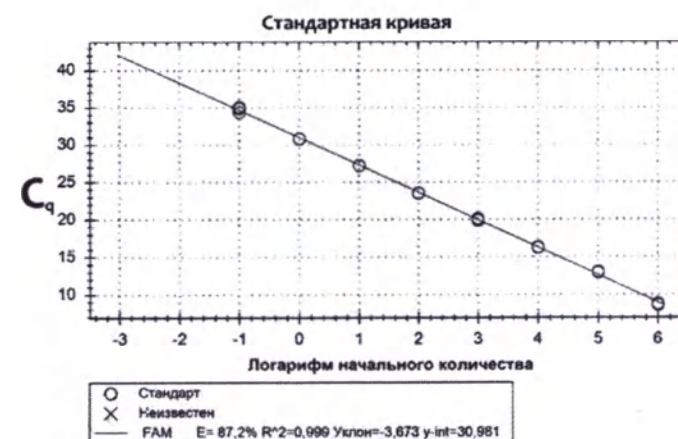
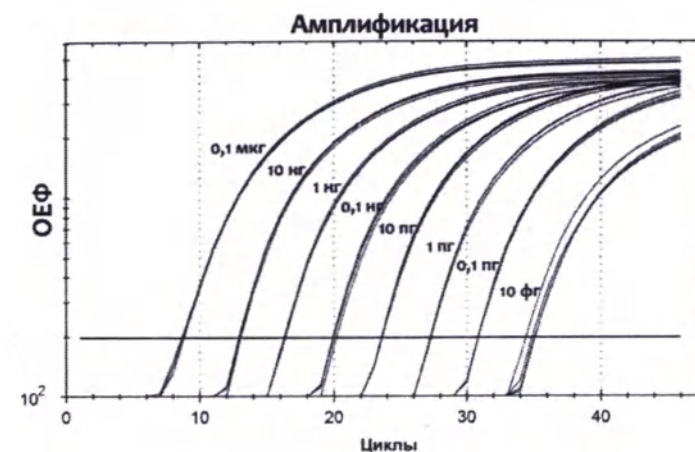
Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	5-15 сек	30 - 50
Отжиг/элонгация	50 - 68	30-60 сек	

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации.

Хранение: в месте, защищенном от попадания света: при +25 °C – 7 дней; при +4 °C – 4 месяца; при -20 °C – 18 месяцев; не более 50 циклов замораживания-размораживания.

Транспортировка: при 0 - +4 °C, допускается транспортировка при комнатной температуре до 3-х дней.

Область линейности системы БиоМастер HS-qPCR (2х)



Амплификация фрагмента кДНК гена 18S мРНК в серии 10 кратных разведений от 10 фг до 1 мкг. Длина ампликона – 120 п.н. Реакция проводилась на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad).

Рекомендации для предупреждения контаминаций при ПЦР.

Во время ПЦР нарабатывается более 10 миллионов копий ДНК-матрицы. Таким образом, необходимо следить за возможностью попадания других матриц и ампликонов которые могут присутствовать в лаборатории. Ниже представлены общие рекомендации для снижения риска контаминации:

- Процедуры по подготовке ДНК образцы, открывайте и пипетируйте ПЦР смесь, амплификацию и анализ ПЦР продуктов необходимо проводить в разных территориальных зонах.
- Подготавливайте ПЦР смеси в ПЦР-шкафах с ламинарным потоком и оснащенных УФ-лампой.
- Используйте новые перчатки для очистки ДНК и приготовления ПЦР смесей.
- Используйте реагенты, предназначенные для ПЦР. Используйте наконечники для пипеток снабженные аэрозольным фильтром для подготовки ДНК образцов и замешивания смесей ПЦР.
- Всегда готовьте смесь без ДНК матрицы (отрицательный контроль) для проверки на контаминацию.

Рекомендации для подбора праймеров

Для подбора праймеров и зондов рекомендуется использовать программу Oligo <http://www.oligo.net/> или аналоги. При отборе олигонуклеотидов соблюдайте следующие требования:

праймеры

- Длина 18-22 п.о.;
- Теоретические Tm между парой праймеров не должна отличаться более чем на 2 °C;
- Праймеры для проведения TaqMan ПЦР должны иметь Tm не менее 60 °C;
- GC состав праймеров в границах 40 – 60%;
- Длина продукта 70 – 150 п.о.;
- Минимизируйте вторичные структуры. Лучше их полное отсутствие.
- Проверьте свои праймеры при помощи BLAST.

зонды

- Длина 22-26 п.о.;
- Температура плавления: 68-70°C.
- Минимум одинаковых нуклеотидов подряд (особенно G: не более 4-х подряд).
- Выбирайте ту цель ДНК, на которой в пробе будет чаще встречаться C, чем G.
- На 5'-конце не должно быть G.
- Избегайте образование димеров зонда с праймерами и самокомплементарности.

Образцы ДНК

- Чистота и целостность ДНК очень важна для успешного проведения ПЦР. Для выделения образцов ДНК, используйте стандартные методики, позволяющие в дальнейшем проводить амплификацию; В процессе подготовки и работы с образцами максимально ограничивайте

использование ПЦР ингибиторов (фенол, гемин и др.). В случае очистки образцов в геле, минимизируйте воздействие УФ излучения, для предотвращения пиридиновых димеров;

- Подготовку реакционной смеси проводите в чистой зоне, используйте наконечники для пипеток с фильтром для уменьшения вероятности контаминации;
- Оптимальное количество ДНК, используемое в реакции, зависит типа образца и его чистоты. Например, для ДНК фага лямбда ~ 0,1 нг; ДНК *E.Coli* ~ 10 нг; ДНК человека ~10 – 50 нг.

Характеристики циклов амплификации

Начальная ДНК денатурация и активация фермента

Очень важно достигнуть полной денатурации ДНК-матрицы в начале ПЦР, что обеспечит её эффективное использование во время первого цикла амплификации. Если GC состав матрицы 50% и менее достаточно 5 мин начальной денатурации при 95 °C.

Денатурация

Общепринятым временен денатурации на цикл в случае ПЦР в реальном времени считается 15 - 30 сек при 95 °C.

Отжиг праймеров и элонгация

Для TaqMan формата проведения ПЦР в реальном времени стадия отжига и элонгации как правило объединяется в одну стадию с температурой 58-60 °C и длительностью 60 сек.

Количество циклов

Если имеется менее 10 копий ДНК-матрицы на реакцию, то для эффективной амплификации необходимо не менее 40 циклов. Для большего количества матрицы достаточно 25 - 35 циклов.

Экзодексирибонуклеазная активность

ДНК была стабильна после инкубации 1 мкг фрагмента ДНК фага лямбда в присутствии 25 мкл **БюоМастер HS-qPCR (2x)** в 50 мкл реакционной смеси в течение 4 ч. при 37 °C и 70 °C.

Рибонуклеазная активность

Отсутствие рибонуклеазной активности было подтверждено после инкубации 1 мкг 5'-[P³²] меченого фрагмента РНК в присутствии 25 мкл **БюоМастер HS-qPCR (2x)** в 50 мкл реакционной смеси в течение 4 ч. при 37 °C.

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Т/ф (383) 363-51-91
<http://www.biolabmix.ru>



В данном Документе
прошито 3 листа,
пронумеровано и скреплено
печатью 3 листов
Три
прописью
Зав. ОТК И. Р. Бореичев
должность, подпись